

熊小平,文湘华,白亚楠,等. 2008. 白腐真菌发酵中胞外蛋白酶对 MnP 的产生及其稳定性的影响 [J]. 环境科学学报, 28 (5): 866 - 872

Xiong X P, Wen X H, Bai Y N, *et al* 2008. The influence of protease on manganese peroxidase (MnP) stability during white rot fungus culture [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 28 (5): 866 - 872

白腐真菌发酵中胞外蛋白酶对 MnP 的产生及其稳定性的影响

熊小平,文湘华*,白亚楠,徐康宁,钱易

清华大学环境科学与工程系,环境模拟与污染控制国家重点实验室,北京 100084

收稿日期: 2006-12-07 录用日期: 2007-11-29

摘要:在摇瓶试验中通过投加 4 种对应不同蛋白酶的抑制剂,研究了白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 固定化发酵过程中所产的胞外蛋白酶对其 MnP 的产生以及稳定性的影响. 在培养 1d 后投加 Pepstatin A 可使 MnP 峰值提高且提前 1d 出现,而投加 PMSF、EDTA 后 MnP 峰值出现时间不变但峰值皆下降;培养 4d 后投加 PMSF 和 Pepstatin A 可使 MnP 酶活提高且稳定性增强;培养过程中投加 HgCl₂ 均会抑制菌体生长,使 MnP 酶活水平较低. 在培养 1d 后直接补入初级蛋白酶浓缩液, MnP 峰值酶活稍有提高,且第 3d 补入初级蛋白酶浓缩液会使 MnP 提前 1d 出现. 在离体条件下, EDTA 和 HgCl₂ 均可抑制 MnP 酶活;初级蛋白酶和次级蛋白酶均会导致 MnP 不稳定,但投加 PMSF 和 Pepstatin A 后, MnP 稳定性增强. 以上结果表明,在培养过程中初级蛋白酶部分组分对 MnP 的产生过程具有促进作用;初级蛋白酶和次级蛋白酶会导致离体 MnP 迅速失活,且证实其中 2 种组分——丝氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶——可导致离体 MnP 不稳定.

关键词:白腐真菌;黄孢原毛平革菌;锰过氧化物酶;稳定性;蛋白酶

文章编号: 0253-2468(2008)05-866-07 中图分类号: X171.4 文献标识码: A

The influence of protease on manganese peroxidase (MnP) stability during white rot fungus culture

X DNG Xiaoping, WEN Xianghua*, BA I Yanan, XU Kangning, Q IAN Yi

State Key Joint Laboratory Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084

Received 7 December 2006; accepted 29 November 2007

Abstract: Effect of extracellular protease on MnP production and stability was investigated through addition of 4 protease inhibitors corresponding to 4 different proteases. Tests were performed on immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* in agitated Erlenmeyer flasks. Pepstatin A addition on the 1st day of culture increased the maximum MnP value, which also moved up the MnP peak moment. However, PMSF and EDTA addition decreased the maximum MnP activity while keeping the same peak moment. PMSF and Pepstatin A addition on the 4th day helped stabilize MnP by retaining its activity on a higher level. HgCl₂ addition on the 1st and 4th days both showed inhibition of biomass growth, which subsequently caused low MnP activity. When concentrated primary protease was added, a peak of higher MnP activity appeared. Particularly, addition of concentrated primary protease on the 3rd day caused MnP emergence 2 days earlier. Of all the protease inhibitors, EDTA and HgCl₂ inhibited MnP activity *in vitro*. Both primary and secondary proteases destabilized MnP but PMSF and Pepstatin A addition helped keep MnP stable to some extent. These results indicated: some component of primary protease favors MnP production during the culture; both primary and protease destabilize existing MnP; MnP destabilization is caused by serine protease and aspartic protease in both primary and secondary proteases.

Keywords: white rot fungus; *Phanerochaete chrysosporium*; manganese peroxidase; enzyme stability; protease

1 引言 (Introduction)

由于白腐真菌在营养限制条件下所产的木质

素酶 (木质素过氧化物酶 LiP 和锰过氧化物酶 MnP) 能有效降解众多难降解污染物 (Barr *et al*, 1994; Cameron *et al*, 2000), 国内外针对白腐真菌

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 50478010)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50478010)

作者简介: 熊小平 (1980—), 男, 博士生; *通讯作者 (责任作者), E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

Biography: X DNG Xiaoping (1980—), male, Ph.D. Candidate; * Corresponding author, E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

发酵产木质素酶进行了大量的研究.但是如何提高木质素酶在发酵过程中的产量以及稳定性依旧是木质素酶大规模生产与实际应用中的瓶颈问题 (Cabaleiro *et al* ,2002).

在发酵过程中产生胞外蛋白酶是大多数真菌共有的特性.根据胞外蛋白酶的活力峰值出现时间,可将其分为初级蛋白酶和次级蛋白酶 (Dosořetz *et al* ,1990a).研究表明,尽管此 2种胞外蛋白酶中的主要成分不尽相同,但都含有 4种蛋白酶,即分别被 EMSF、Pepstatin A、EDTA 和 $HgCl_2$ 所抑制的丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶 (Cabaleiro *et al* ,2001, 2002; Dey *et al* ,1991; Asit, 1992; Dass *et al* ,1995; Darah *et al* ,1996; Staszczak *et al* ,1996).

不少研究者指出,胞外蛋白酶是导致 LiP不稳定的重要影响因素 (Dosořetz *et al* ,1990b; Pascal *et al* ,1993;喻云梅等,2005),因此,有人认为胞外蛋白酶会以同样方式影响 MnP (Jimenez *et al* ,2003),但实际上针对蛋白酶对 MnP产生与稳定性影响的研究并不多见. Dosořetz等 (1990a)发现,在 *Phanerochaete chrysosporium* 培养中通过添加 EMSF抑制胞外次级蛋白酶活性,可提高 MnP的稳定性. Cableiro等 (2001, 2002)则通过加入 $HgCl_2$ 达到提高 MnP稳定性的目的,并提出发酵体系内蛋白酶活性越高 MnP产量越不稳定的观点. Darah 和 Ibrahim (1996)通过添加 pCMB 抑制半胱氨酸蛋白酶实现了更高及更稳定的 MnP产量. Jimenez等 (2003)认为,初级蛋白酶对 MnP的产生有促进作用,而次级蛋白酶会导致 MnP不稳定.以上这些研究相对分散,并且得到的关于不同胞外蛋白酶成分对 MnP影响的结果也不一致.

为此,本研究中在培养过程和离体状态 2种条件下分别研究白腐真菌自身所产的蛋白酶与 MnP之间的关系.在培养过程中选择 2个不同时间点分别进行对应于 4种胞外蛋白酶的抑制剂的补料,以确定初级与次级蛋白酶内各组分对 MnP产生及稳定性的影响;同时制取并直接补入初级蛋白酶,确定其对 MnP产生的影响.在离体条件下通过混合培育蛋白酶(初级蛋白酶与次级蛋白酶)、部分纯化的 MnP以及蛋白酶抑制剂以确定各种蛋白酶组分对 MnP离体稳定性的影响.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 菌株

试验中采用的白腐真菌菌株为本实验室保存的 *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767.

2.2 培养基

固体培养基采用 PDA 培养基,成分为:马铃薯浸出液 $200g \cdot L^{-1}$,葡萄糖 $20g \cdot L^{-1}$,琼脂 $20g \cdot L^{-1}$.液体培养基参照 Tien和 Kirk (1988)的基础培养基进行配置,其中采用醋酸 醋酸钠缓冲溶液.

2.3 载体

固定化载体为聚氨酯泡沫块 ($0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm$).载体在沸水中煮 20min后用去离子水清洗 3遍,干燥后灭菌备用 (Couto *et al* ,2002).

2.4 培养条件

将保存的菌种接种到 PDA 固体培养基上,在 37 进行放大培养 7~8d后用接种针剥取适量孢子于无菌水中制成孢子悬浊液;而后等量接入含有 50mL液体培养基、0.9g载体的一系列 250mL锥形瓶内,接种终浓度为 1×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$.接种后置于 37 恒温摇床内培养,摇床转速为 $160r \cdot min^{-1}$.

2.5 发酵样品浓缩

收集发酵样品,冷冻去除多糖后于 4、12000 $r \cdot min^{-1}$ 条件下离心 30min 取上清液在超滤杯内浓缩,超滤膜截留相对分子量为 100000,杯内压力为 0.2 MPa

2.6 酶活性测定

采用 Azo dye-impregnated collagen作为底物测定蛋白酶活性 (Dosořetz *et al* ,1990a);采用 Mn^{2+} 作为底物测定 MnP活性 (Paszczyński *et al* ,1988).

2.7 试验方案

2.7.1 培养过程中补料实验

1)针对 4种蛋白酶——丝氨酸蛋白酶 (Serine protease)、半胱氨酸蛋白酶 (Cysteine protease)、金属蛋白酶 (Metalloproteinase)和天冬氨酸蛋白酶 (Aspartic protease)——分别选择对应的蛋白酶抑制剂 EMSF、 $HgCl_2$ 、EDTA 和 Pepstatin A;在发酵培养过程中第 1天和第 4天分别加入各种抑制剂,对比观察各个发酵体系内 MnP活性变化.各种抑制剂与蛋白酶对应关系以及各抑制剂补料终浓度见表 1.

表 1 黄孢原毛平革菌发酵过程中补入的各种蛋白酶抑制剂

Table 1 Four kinds of inhibitor additions during the culture of

Phanerochaete chrysosporium

蛋白酶抑制剂	对应蛋白酶	补料终浓度 / (mmol·L ⁻¹)	补入时间
PMSF	Serine protease	1.0	第 1、4天
HgCl ₂	Cysteine protease	2.4	第 1、4天
EDTA	Metalloproteinase	2.4	第 1、4天
Pepstatin A	Aspartic protease	0.001	第 1、4天

2)培养、收获并浓缩初级蛋白酶(方法见 2.7.2 节),将其在发酵培养第 1天后加入到发酵系统内(用 10mL 初级蛋白酶浓缩液替代锥形瓶内 5mL 发酵液).对比观察投加与未投加初级蛋白酶的发酵体系内 MnP 的变化情况,各溶液内蛋白酶与 MnP 活性数据见表 2

表 2 补入初级蛋白酶时,各蛋白酶溶液与发酵液内 MnP 与蛋白酶活性

Table 2 MnP and protease activity of the primary protease samples and culture mixture

样品溶液	蛋白酶活性 / (U·mL ⁻¹)	MnP 活性 / (U·L ⁻¹)	说明
初级蛋白酶 1	3.1	0	样品由第 2 天发酵液浓缩制成
初级蛋白酶 2	7.6	0	样品由第 3 天发酵液浓缩制成
发酵液	/	0.8	数据为第 1 天后测定结果

2.7.2 MnP 离子稳定性实验 在培养过程中分别收集 MnP、初级蛋白酶和次级蛋白酶并超滤浓缩.在室温条件下,分别将浓缩后的初级蛋白酶、次级蛋白酶与 MnP 样品以及蛋白酶抑制剂(PMSF 和 Pepstatin A)混合后在室温下培育 1h,然后测定其中 MnP 活性变化情况.以初级蛋白酶为例,各混合体系成分见表 3.

表 3 MnP 离子稳定性实验中各混合体系成分

Table 3 Contents of mixtures in the *in vitro* MnP stability experiment

样品序号	MnP /mL	蛋白酶 /mL	PMSF / (mmol·L ⁻¹)	Pepstatin A / (μmol·L ⁻¹)	去离子水 /mL	总体积 /mL
1		1	1.0		1	2
2		1		1.0	1	2
3	1	1				2
4	1	1	1.0			2
5	1	1		1.0		2
6	1		1.0		1	2
7	1			1.0	1	2
8		1			1	2
9	1				1	2

3 结果 (Results)

3.1 培养过程中各种蛋白酶抑制剂补料对 MnP 发酵的影响

在第 1 天后,摇瓶内菌体还处于生长状态,此时补加 4 种蛋白酶抑制剂后各发酵体系内 MnP 活性曲线在 2~7d 内有明显差异(图 1a),此差异主要表现在 MnP 的峰值大小和峰值出现时间.空白样 MnP 酶活峰值为 293U·L⁻¹,出现时间为第 4 天;补入 Pepstatin A 后,第 3 天 MnP 酶活峰值为 367U·L⁻¹,其出现时间与空白样相比有所提前且峰值大小略有提高;PMSF 和 EDTA 补料对 MnP 峰值出现时间

没有影响,但会导致 MnP 酶活峰值下降,相应峰值大小分别为 249U·L⁻¹和 170U·L⁻¹;补加 HgCl₂ 的体系内 MnP 一直很低(小于 30U·L⁻¹).

在培养第 4 天后 MnP 酶活达到峰值,此时补加 4 种蛋白酶抑制剂各发酵体系内 MnP 活性曲线差异存在于 7~12d(图 1b).蛋白酶抑制剂的补加并没有改变第 4~7 天之间 MnP 酶活下降的趋势;从第 8 天以后,空白体系内 MnP 酶活维持在 10U·L⁻¹附近,投加 EDTA 和 HgCl₂ 的发酵体系中 MnP 酶活与空白体系接近,但投加 PMSF 和 Pepstatin A 的发酵体系内 MnP 酶活平均都维持在 160U·L⁻¹附近.

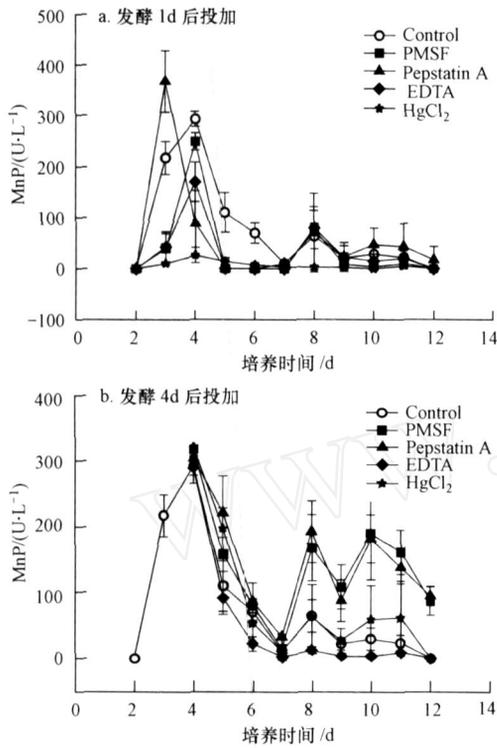


图 1 在 *Phanerochaete chrysosporium* 培养过程中 4 种蛋白酶抑制剂补料对 MnP 产生的影响

Fig 1 Effects of four protease inhibitors on MnP production during the culture of *Phanerochaete chrysosporium*

3.2 培养过程中补入初级蛋白酶对 MnP 发酵的影响

在 *Phanerochaete chrysosporium* 培养过程中第 1 天补入其本身所产的初级胞外蛋白酶对 MnP 发酵的影响如图 2 所示. 加入初级蛋白酶后, MnP 峰值酶活稍有提高; 空白样、加入初级蛋白酶、初级蛋白

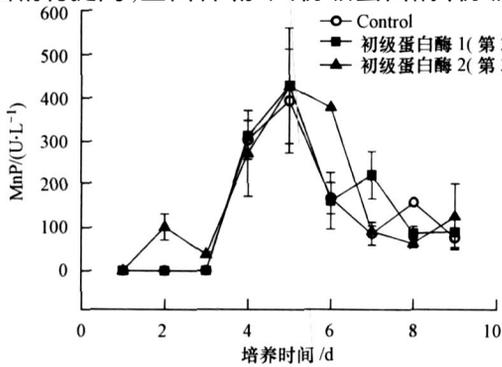


图 2 在 *Phanerochaete chrysosporium* 培养过程中投加浓缩后的胞外初级蛋白酶对 MnP 产生的影响

Fig 2 Effect of concentrated extracellular primary protease addition on MnP production during the culture of *Phanerochaete chrysosporium*

酶 2 的体系中第 5 天的 MnP 酶活分别为 390、426 和 425 $U \cdot L^{-1}$. 在加入初级蛋白酶 2 后, MnP 出现时间明显提前, 在培养第 2 天时体系内酶活达到 100 $U \cdot L^{-1}$.

3.3 蛋白酶对 MnP 离体稳定性的影响

试验过程中发现, 4 种蛋白酶抑制剂中 EDTA 可完全抑制 MnP 活性, $HgCl_2$ 也抑制大部分 MnP 活性, 所以, 此试验中只考虑添加 PMSF 和 Pepstatin A 考察 MnP 的离体稳定性.

图 3a 为初级蛋白酶溶液对 MnP 离体稳定性影响试验结果. 试验制备的初级蛋白酶溶液中不含 MnP 活性 (8 号样品), 且在其中加入 PMSF 或 Pepstatin A 后依旧保持为零 (1、2 号样品). MnP 样品的活力为 268 $U \cdot L^{-1}$ (9 号样品), 分别加入 PMSF 和 Pepstatin A 1h 后 MnP 活力为 262 $U \cdot L^{-1}$ 和 251 $U \cdot L^{-1}$ (6、7 号样品), 有小幅度的下降. 在 MnP 溶液内加入初级蛋白酶溶液在室温下培育 1h 后其活力为 172 $U \cdot L^{-1}$ (3 号样品), 相对下降 96 $U \cdot L^{-1}$. 而在 MnP、初级蛋白酶溶液内加入 PMSF 和 Pepstatin A 后样品的 MnP 活力分别为 192 $U \cdot L^{-1}$ 和 208 $U \cdot L^{-1}$, 相对下降 76 $U \cdot L^{-1}$ 和 60 $U \cdot L^{-1}$, 比未加蛋白酶抑制

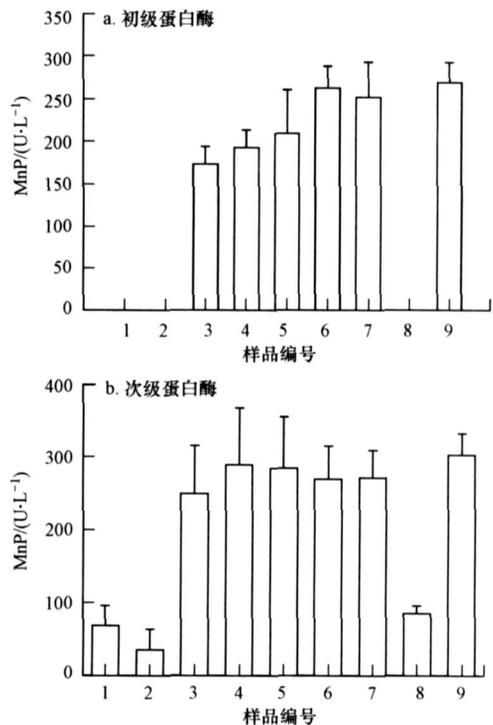


图 3 在部分纯化浓缩 MnP 溶液中加入浓缩蛋白酶溶液对 MnP 活性的影响

Fig 3 Effect of concentrated proteases on the stability of partially purified MnP in vitro

剂样品有所改善。

图 3b为次级蛋白酶溶液对 MnP离体稳定性影响试验结果. 制备的次级蛋白酶溶液中含有少量 MnP活性, 活力为 $85\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$. 在其中加入 EMSF和 Pepstatin A后 MnP活力有些许下降, 其 MnP活力值分别为 $69\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $36\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$. 空白 MnP溶液酶的活力为 $303\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入蛋白酶抑制剂会导致其活力下降, 具体活力值分别为 $270\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $271\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$. 将次级蛋白酶和 MnP溶液混合培育, MnP总活力值下降达到 $138\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$; 而由于 EMSF和 Pepstatin A的加入下降趋势有所减少, 其活力减少值分别为 $49\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $44\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$.

4 讨论 (Discnssion)

蛋白酶对白腐真菌发酵作用包括 2个方面, 其一为对发酵产 MnP过程的影响; 其二为对已产生的 MnP稳定性的影响。

4.1 蛋白酶对 MnP发酵过程的影响

在第 1天添加各种蛋白酶抑制剂是为了观察发酵过程中的各种初级蛋白酶被抑制后体系内 MnP酶活的变化趋势, 从而间接推测各种初级蛋白酶对 MnP发酵产生的影响. 从试验结果可以看出, EMSF和 EDTA的加入导致了 MnP产酶量下降, 所以它们所对应抑制的蛋白酶, 即丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶可能对 MnP的产生有促进作用; Pepstatin A的加入将导致 MnP产量提高且峰值出现时间提前, 所以它所对应抑制的天冬氨酸蛋白酶可能不利于 MnP的产生或稳定(图 1a).

而在 MnP酶活峰值出现时刻, 即第 4天, 补入各种蛋白酶抑制剂是为了确定各种次级蛋白酶被抑制后体系内 MnP酶活的变化, 从而间接推测各种次级蛋白酶对 MnP稳定性的影响. 从试验结果可以看出, 加入各种蛋白酶抑制剂均不能转变或减缓 MnP酶活下降趋势(图 1b, 4~7d), 说明在此阶段影响 MnP稳定性的不是蛋白酶而是其它因素. Dass等(1995)在对白腐真菌胞外次级蛋白酶进行电泳试验发现, 其 2种主要成分分别被 EMSF和 Pepstatin A抑制. 本试验中加入 EMSF和 Pepstatin A的系统内从第 8天以后 MnP酶活上升则进一步说明, 它们所对应抑制的丝氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶在发酵后期对 MnP活性有抑制作用。

有部分文章曾经报道过, 将 HgCl_2 补料应用于白腐真菌发酵过程以优化产酶. Cabaleiro等(2001)

在白腐真菌半固态发酵中加入 $4.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HgCl}_2$ 用于抑制蛋白酶, 使 MnP的稳定性稍有提高, 但导致菌体死亡. 鲁时瑛等(2003)则研究了 HgCl_2 的最佳添加时间(第 4天)及最佳添加浓度($1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 更好地保持了 MnP的稳定性. 在本试验中第 1、4天后投加 $2.4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HgCl}_2$ 的摇瓶相对于其它摇瓶生物生长明显受到限制, 这可能是其导致 MnP酶活一直偏低的主要原因; 而 HgCl_2 对黄孢原毛平革的毒害作用可能与其投加浓度有关。

Dosoretz等(1990)在白腐真菌发酵过程中 3个不同时刻(发酵开始, 发酵 1d后, MnP峰值时)分别加入 $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EMSF, 其试验结果表明, 发酵开始或者发酵 1d后投加有利于提高 MnP峰值, 而且在 MnP峰值时刻加入将极大程度提高 MnP的稳定性. 本试验的结果与之差异较大, 可能因为: 发酵培养条件不同会导致代谢过程的差异; EMSF的投加浓度不同会导致对系统影响的差异。

针对前述初级蛋白酶对 MnP产生有正面作用的结论, 设计试验在发酵开始阶段直接加入菌体自身所产初级蛋白酶. 初级蛋白酶补料引起的 MnP酶活提前产生及其峰值酶活提高的现象表明, 初级蛋白酶对 MnP的产生有促进作用(图 2). 此现象与前述第 1天补入各种抑制剂部分得到的结论相一致. 但 3种实验条件下产酶效果差异较小的可能因为: 浓缩的蛋白酶液加入摇瓶后, 由于稀释作用发酵液内蛋白酶浓度实际增加值相对于空白样中蛋白酶浓度较小; 初级蛋白酶中不同种类蛋白酶对 MnP产生的作用不一致, 正面促进作用被部分负面作用抵消; 生物体根据外界条件变化具有自我调节机制。

关于初级蛋白酶对 MnP产生过程的影响, Jimenez等(2003)根据白腐真菌产 MnP前蛋白酶浓度会上升的现象做出推测: 初级蛋白酶促进了 MnP的产生. 而本试验结果证实了此推测。

4.2 蛋白酶对 MnP离体稳定性的影响

为了排除生物生长的干扰, 确定蛋白酶对 MnP稳定性的影响, 进行了 MnP离体稳定性试验. 从试验结果可以看出(图 3), 加入 EMSF和 Pepstatin A对 MnP活力有影响, 但由此导致的 MnP活力下降幅度较小; 推测其可能因为少量有机溶剂影响了测定体系. 同时, 初级蛋白酶和次级蛋白酶的加入都导致 MnP活力下降, 而通过添加蛋白酶抑制剂 EMSF和 Pepstatin A可以部分缓解蛋白酶对 MnP的

负面作用.此结果表明,初级蛋白酶和次级蛋白酶中都含有丝氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶,且这2种蛋白酶都可以导致MnP不稳定.由于抑制两种蛋白酶后仍不能抵消整个蛋白酶溶液对MnP活力的负面影响,故其它2种蛋白酶对MnP稳定性也有影响;由于另外2种抑制剂对MnP活性有抑制作用,所以半胱氨酸蛋白酶和金属蛋白酶对MnP的具体作用大小尚不能推测.

关于蛋白酶对MnP离体稳定性影响的研究很少,相对而言更多的文献报导了发酵过程中蛋白酶与MnP浓度之间的关系以及其中的蛋白酶成分.尽管发酵条件不尽相同,Dey等(1991)认为,*Phanerochaete chrysosporium*发酵过程中自身所产酸性蛋白酶对目标酶的产生过程具有调控作用,碱性与中性条件(根据活力最高时pH值分类)则对离体存放时稳定性有影响;Cabaleiro等(2002)发现,发酵过程中会产生大量半胱氨酸蛋白酶与酸性蛋白酶,皆对MnP活性有影响;鲁时瑛等(2003)在发酵过程中投加HgCl₂进行试验,并认为,蛋白酶的主要作用不是抑制MnP产生,而是促进MnP分解.这些报导中都没有进行相应的离体试验,而且研究的蛋白酶种类也不全面.

5 结论 (Conclusions)

1)黄孢原毛平革菌发酵过程中,在培养1d后补入4种蛋白酶抑制剂,其中EMSF、EDTA使MnP峰值下降;而补入初级蛋白酶后可使MnP提前产生,且峰值提高;说明其初级蛋白酶部分成分对MnP产生过程有促进作用.

2)MnP离体稳定性试验中加入初级蛋白酶将导致其酶活迅速下降,加入蛋白酶抑制剂EMSF和Pepstatin A可以改善其下降程度,说明初级蛋白酶可导致MnP不稳定.而且培养第1天后补入Pepstatin A可使MnP峰值提高且出峰时间提前,说明初级蛋白酶中天冬氨酸蛋白酶具有使MnP不稳定的性质.

3)发酵过程中第4天后补入4种蛋白酶抑制剂,其中EMSF和Pepstatin A可使MnP酶活上升且稳定性良好;在MnP离体稳定性试验中,次级蛋白酶可导致MnP迅速失活,且加入EMSF、Pepstatin A可分别改善MnP的失活程度;说明次级蛋白酶内含有丝氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶可以导致MnP不稳定.

4)MnP离体稳定性试验中,EMSF、Pepstatin A补入对蛋白酶导致MnP失活的改善程度小于其MnP失活的总体趋势,说明初级、次级蛋白酶内其它蛋白酶组分对MnP活性具有抑制效果;但由于EDTA、HgCl₂本身对MnP活性有抑制作用,尚不能确定金属蛋白酶与半胱氨酸蛋白酶对MnP的作用,有待进一步研究.

责任作者简介:文湘华(1960—),女,教授.研究方向为水污染控制理论与技术、高效微生物及其酶、高效生物反应器、微生物群落结构.

References:

- AsitDatta 1992 Purification and Characterization of a Novel Protease from Solid Substrate Cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 267: 728—736
- Barr D P, Aust S D. 1994. Pollutant degradation by white-rot fungi [J]. Rev Environ Contam T, 138: 49—72
- Cabaleiro D R, Rodriguez S, Sanroman A, et al 2001. Characterisation of deactivating agents and their influence on the stability of manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. [J]. Journal of Chemical Technology and biotechnology, 76: 867—872
- Cabaleiro D R, Rodriguez S, Sanroman A, et al 2002. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media [J]. Process Biochem, 37: 1017—1023
- Cameron M D, Timofeevski S, Aust S D. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 54: 751—758
- Couto S R, Barreiro M, Rivela I, et al 2000. Performance of a solid-state immersion bioreactor for ligninolytic enzyme production: evaluation of different operational variables [J]. Process Biochem, 38: 219—227
- Darah I, Ibrahim C O. 1996. Correlation between degradation of lignin degrading enzymes and proteolytic activities in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Asia-pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 4: 203—209
- Dass S B, Dosoretz C G, Reddy C A, et al 1995. Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-ligninolytic conditions [J]. Archives of Microbiology, 163: 254—258
- Dey S, Maiti T K, Saha N, et al 1991. Extracellular protease and amylase activities in ligninase-producing liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Process Biochem, 26: 325—329
- Dosoretz C G, Chen H C, Grethlein H E 1990a. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl Environ Microbiol, 56: 395—400
- Dosoretz C G, Dass S B, Reddy C A, et al 1990b. Protease-mediated

- degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 56: 3429—3434
- Jimenez Tobon G, Kurzatkowski W, Rozbicka B, *et al* 2003. In situ localization of manganese peroxidase production in mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Microbiology-sgn*, 149: 3121—3127
- Lu S Y, Wang S Y, LI H Z, *et al* 2003. Effect of *Phanerochaete chrysosporium* Produced Protease on Peroxidases [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 22: 23—26 (in Chinese)
- Pascal Bonname, Mich le Asther and Marcel Asther 1993. Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on lignin peroxidase activity [J]. *Journal of Biotechnology*, 30: 271—282
- Paszczynski A, Crawford R L, Huynh V B. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification [J]. *Method Enzymol*, 161: 264—270
- Staszczak M, Nowak G, Grzywnowicz K, *et al* 1996. Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi [J]. *Journal of Chemical Technology and biotechnology*, 36: 193—203
- Tien M, Kirk T K 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Method Enzymol*, 161: 238—249
- YU YM, LU B, WENG S Q, *et al* 2005. Review on the production and regulation mechanism of ligninolytic enzymes of the white rot fungi [J]. *Journal of Safety and Environment*, 5: 82—86 (in Chinese)

中文参考文献:

- 鲁时瑛, 王树英, 李华钟, 等. 2003. 黄孢原毛平革菌产蛋白酶对过氧化物酶的影响 [J]. *无锡轻工大学学报*, 22: 23—26
- 喻云梅, 刘赟, 翁思琪, 等. 2005. 白腐真菌木质素降解酶的产生及其调控机制研究进展 [J]. *安全与环境学报*, 5: 82—86